



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

INDUKSI KALUS BEBERAPA GENOTIPE JERUK (CITRUS SP.) DENGAN MENGGUNAKAN 2,4-D SECARA IN VITRO

SKRIPSI



TIARA YULIANTI
0910212040

FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2015

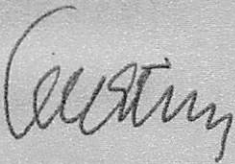
**INDUKSI KALUS BEBERAPA GENOTIPE JERUK (*Citrus sp.*)
DENGAN MENGGUNAKAN 2,4-D SECARA *IN VITRO***

OLEH

**TIARA YULIANTI
0910212040**

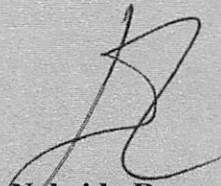
MENYETUJUI :

Dosen Pembimbing I



Dr. Ir. Gustian, MS
NIP. 196025081986031003

Dosen Pembimbing II



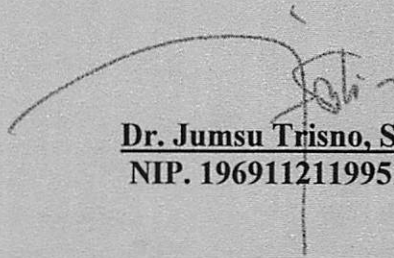
Dr. Ir. Nalwida Rozen, MP
NIP. 196504041990032001

**Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Andalas**



Prof. Ir. Ardi, MSc.
NIP. 195312161980031004

**Ketua Program Studi Agroekoteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Andalas**



Dr. Jumsu Trisno, SP, MSi.
NIP. 196911211995121001

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"Niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat (QS: Al-Mujadilah 11)"

"Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan maka apabila kamu telah selesai mengerjakan sesuatu maka kerjakanlah yang lain dan hanya kepada Allah lah kamu hendaknya berharap (QS: Alam Nasyrat: 5-8.)"

Ya Allah,

Waktu yang sudah kujalani dengan jalan hidup yang sudah menjadi takdirku, sedih, bahagia dan bertemu orang-orang yang memberikan semua pengalaman bagiku, yang telah memberi warna-warni kehidupanku. Kubersujud dihadapan Mu, Engkau berikan aku kesempatan untuk bisa sampai penghujung awal perjuanganku segala puji bagi Mu Ya Allah. Semoga keberhasilan ini menjadi satu langkah awal bagiku untuk meraih cita-citaku, tiada syukurku selain berharap engkau jadikan aku orang yang senantiasa berpikir, berilmu, beriman dan bersabar dalam menjalani kehidupan ini. Seuntai doa dan terima kasih ku ucapkan kepada Ayahanda dan Ibunda yang selama ini memberiku semangat, doa, dorongan, nasehat dan kasih sayang serta pengorbanan yang tak tergantikan sehingga aku kuat menjalani setiap rintangan yang ada.

Sebuah karya tulis ini kupersembahkan kepada Ayahanda (Irmizal) dan Ibunda (Idesmi) yang tercinta serta seluruh keluarga besarku Uda Herko Arianto & Kakak Ipar Ana Sefrianti, SE, Kak Elfitri & Bg Ipar Reyon, Abg Febriony, SE & Kakak Ipar Neno Hariani, Amd Kep, Adekku sayang Devi Melani dan keponakan kesayangan Muhammad Hashif Azzam. Terima kasih sanak saudara di Muaro Paiti.

Serta ku ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya untuk kedua orang tua ku Bapak Dr. Ir. Gustian, MS dan Ibu Dr. Ir. Nafwida Rozen, MP selaku pembimbing yang telah memberi saran, perhatian dan bantuan sehingga aku bisa menggapai cita-cita ini.

Terima kasih pada keluarga besar Kultur Jaringan (Buk aisyah, Kak Yet, Kak Lata, Ari Gefri, candra, amel dan Setri) terima kasih juga kepada Breeder 12, 11 dan 09 (ade, andrianto, febi dan matius) dan Agro 09 (dian dan puput). Terima kasih juga kepada teman satu bimbingan April yang selalu setia membantu dan moga cepat selesainya ya Fitri, Khairul (Editor) dan Selvia Ayuni, SP, semangat untuk teman-teman yang lagi berjuang...

Terima Kasih untuk sahabat-sahabat ku yang selalu setia saat suka dan duka serta memberi motivasi dan selalu setia mendengarkan curahan hati q selama ini BUAT Dahlia Sari, SP, Desi Handayani Lubis, SP, Mercy Santik Loah, SP dan Wriwin Susiani Ginting, SP. Semoga keakraban ini abadi dan segala kebaikan yang telah diberikan menjadi amal shaleh disisi-Nya, amin.....

"HARA YULIANI"

BIODATA

Penulis dilahirkan di Muaro Paiti, Kecamatan Kapur IX, Kabupaten 50 Kota pada tanggal 17 Juli 1990 sebagai anak keempat dari lima bersaudara, dari pasangan Bapak Tarmizal dan Ibu Idesmi. Pendidikan TK Dharma Wanita II Muaro Paiti (1996-1997), Sekolah Dasar (SD) di SD N 30 Muaro Paiti (1997-2003), Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP N 1 Kecamatan Kapur IX (2003-2006), Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA N 1 Kecamatan Kapur IX (2006-2009). Tahun 2009 penulis diterima di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

Padang, Februari 2015

T.Y

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal ini. Shalawat dan salam selalu tercurah buat Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladan bagi umat dalam kehidupan.

Penelitian skripsi ini berjudul, "***Induksi Kalus Beberapa Genotipe Jeruk (Citrus sp.) Dengan Menggunakan 2,4-D Secara In vitro***". Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Pertanian. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang dari Bulan September – Oktober 2014.

Terimakasih yang setulusnya penulis ucapkan kepada Bapak Dr. Ir Gustian, MS sebagai dosen pembimbing I dan Ibu Dr. Ir. Nalwida Rozen, MP sebagai dosen pembimbing II yang sabar dan bijaksana telah memberi petunjuk, arahan, saran, bimbingan dan motivasi. Harapan penulis semoga skripsi ini dapat memberikan inovasi untuk perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan khususnya dibidang pertanian dan bermanfaat bagi kita semua. Kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk kesempurnaan skripsi ini.

Padang, Februari 2015

TY

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR TABEL..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR..... | x |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xi |
| ABSTRAK..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Tujuan..... | 3 |
| C. Manfaat Penelitian..... | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| A. Tanaman Jeruk..... | 4 |
| B. Kultur Jaringan..... | 6 |
| C. Zat Pengatur Tumbuh..... | 8 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 11 |
| A. Waktu dan Tempat..... | 11 |
| B. Bahan dan Alat..... | 11 |
| C. Rancangan Percobaan..... | 11 |
| D. Pelaksanaan..... | 12 |
| E. Pengamatan..... | 15 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 17 |
| A. Saat Muncul Kalus..... | 17 |
| B. Persentase Eksplan Membentuk Kalus..... | 19 |
| C. Tekstur Kalus..... | 21 |
| D. Warna Kalus..... | 22 |
| E. Berat Segar Kalus..... | 24 |
| F. Diameter Kalus..... | 26 |

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 28

 A. Kesimpulan 28

 B. Saran 28

DAFTAR PUSTAKA 29

LAMPIRAN 32

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|----------------|
| 1. Saat terbentuk kalus (HST) beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D | 18 |
| 2. Persentase eksplan membentuk kalus beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D | 20 |
| 3. Warna kalus beberapa genotipe jeruk (35 HST) dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D | 23 |
| 4. Berat segar kalus (mg) umur 35 HST beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D | 25 |
| 5. Diameter kalus (mm) umur 35 HST beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D | 26 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 1. Kalus mulai terbentuk pada bekas sayatan eksplan | 17 |
| 2. Tekstur kalus pada saat umur 35 HST | 22 |
| 3. Warna kalus pada saat umur 35 HST | 24 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|----------------|
| 1. Jadwal Kegiatan Percobaan Bulan September Sampai Oktober 2014 | 32 |
| 2. Dokumentasi Penelitian | 33 |
| 3. Komposisi Media Dasar Murashige dan Skoog | 35 |
| 4. Denah Penempatan Botol Kultur Di Laboratorium Secara RAL | 36 |
| 5. Tabel Analisis Ragam Dari Beberapa Variable Pengamatan | 38 |

INDUKSI KALUS BEBERAPA GENOTIPE JERUK (*Citrus sp.*) DENGAN MENGGUNAKAN 2,4-D SECARA *IN VITRO*

ABSTRAK

Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai Oktober 2014. Tujuannya untuk melihat interaksi antara genotipe jeruk dengan 2,4-D dalam menginduksi kalus, untuk mengetahui genotipe jeruk yang dapat menginduksi kalus dan untuk mendapatkan konsentrasi 2,4-D yang terbaik dalam induksi kalus. Penelitian ini menggunakan percobaan faktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah genotipe jeruk terdiri dari 3 taraf yaitu jeruk Nipis, jeruk Sundai dan jeruk Kesturi. Faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D terdiri dari 4 taraf yaitu 2,5 mg/l, 5 mg/l, 7,5 mg/l dan 10 mg/l. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik dengan uji F pada taraf nyata 5%. Apabila F hitung besar dari F tabel 5%, maka dilanjutkan dengan uji Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf nyata 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi 2,4-D dan berbagai genotipe jeruk yang digunakan terdapatnya interaksi terhadap saat terbentuk kalus. Semua genotipe jeruk dapat menginduksi kalus, genotipe yang paling cepat dalam menginduksi kalus adalah jeruk Nipis. Konsentrasi 2,5 mg/l merupakan konsentrasi terbaik pada saat terbentuk kalus, persentase eksplan membentuk kalus dan diameter kalus. Konsentrasi 5 mg/l merupakan konsentrasi terbaik pada berat segar kalus.

Kata Kunci : Citrus sp, in vitro, kalus, konsentrasi 2,4-D

CALLUS INDUCTION OF SEVERAL GENOTYPE OF CITRUS (*Citrus sp.*) USING 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID *IN VITRO*

ABSTRACT

This research was carried out from September until October 2014. The objective was to examine the interaction between genotype and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during callus induction, to determine the genotypes that can form calli and to determine the best 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration for callus induction. A complete random design with 3 replications was used. The first factor was the genotype (Nipis, Sundai or Kesturi). The second factor was 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration (2.5, 5, 7.5 or 10 mg/l). Data was analyzed statistically using the F test at the 5% level. Significant differences were analyzed further with Duncan's New Multiple Range Test also at the 5% level. Callus formation depended on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration and genotype. Any genotype can form a callus, but the fastest callus induction was with Nipis. The highest percentage of callus formation and largest diameter of calli formed was obtained at a concentration of 2.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The highest fresh weight of calli was obtained with 5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

Key word : Citrus sp, in vitro, a callus, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Jeruk (*Citrus sp.*) merupakan salah satu tanaman tahunan yang berasal dari Asia Tenggara. Sejak ratusan tahun lalu, tanaman ini sudah terdapat di Indonesia, baik sebagai tanaman liar maupun sebagai tanaman pekarangan. Jenis jeruk lokal yang di budidayakan secara komersial oleh masyarakat adalah jenis jeruk keprok (*Citrus nobilis* L), jeruk Siam (*Citrus sinensis* L), jeruk Besar (*Citrus maxima* Herr) sedangkan jenis jeruk yang biasa digunakan sebagai bumbu masakan belum dibudidayakan secara komersial seperti jenis jeruk Nipis, jeruk Kesturi, jeruk Sundai dan jeruk Purut.

Sentra jeruk di Indonesia tersebar di daerah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, Kalimantan Barat, Sulawesi Selatan, Sumatera Utara dan Sumatera Barat (AAK, 1975). Sumatera Barat (Sumbar) sebagai salah satu provinsi penghasil jeruk nasional diharapkan dapat menghasilkan jeruk yang berkualitas dari tahun ke tahun. Produksi jeruk pada tahun 2011, sebanyak 30 t/ha sedangkan tahun 2012 menurun menjadi 28 t/ha dengan luas panen 67,8 ribu ha (Direktorat Jenderal Hortikultura, 2012). Oleh sebab itu, plasma nutfah jeruk di Sumbar memegang peranan penting dalam perakitan varietas unggul baru atau sumber bahan pemuliaan melalui transformasi. Jenis jeruk yang di Sumbar dibudidayakan secara komersial yaitu jenis jeruk keprok Kacang, jeruk Siam dan Gunung Omeh sedangkan jenis jeruk Kesturi, jeruk Nipis dan jeruk Sundai belum dibudidayakan secara komersial namun jenis jeruk tersebut juga memiliki nilai ekonomis.

Jeruk Nipis, jeruk Sundai dan jeruk Kesturi merupakan jenis jeruk yang digunakan dalam kebutuhan sehari-hari. Jeruk tersebut banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bumbu masakan dan memiliki kandungan vitamin C yang tinggi. Jeruk tersebut merupakan potensi lokal yang perlu dapat perhatian dalam pembudidayaan selain itu masyarakat hanya menanam jenis jeruk tersebut sebagai tanaman pekarangan. Hal ini disebabkan karena masyarakat belum menyadari bahwa jenis jeruk lokal tersebut memiliki nilai ekonomis yang penting. Masyarakat belum mendapatkan bibit jeruk yang unggul dalam jumlah banyak,

seragam, produksi tinggi dan tahan hama penyakit. Oleh sebab itu, untuk mengatasi masalah tersebut dibutuhkan suatu alternatif perbanyakan tanaman. Salah satu cara mendapatkan bibit unggul, bebas hama dan penyakit dalam waktu yang efisien adalah kultur *in vitro* dari jenis jeruk tersebut dengan menggunakan bagian tanaman yang bersifat meristematis. Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa kultur *in vitro* merupakan salah satu alternatif untuk menghasilkan bibit dalam jumlah yang cukup banyak, seragam waktu relatif singkat, tanaman berkualitas, tidak tergantung musim dan bebas dari penyakit. Dengan adanya teknik kultur *in vitro* kita bisa memanfaatkan bagian-bagian tanaman yang masih muda untuk perbanyakan tanaman.

Salah satu teknik yang menguntungkan untuk propagasi vegetatif massal dari spesies yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi yaitu dengan embriogenesis (Blanc *et al.*, 1998). Selanjutnya Molina *et al.*, (2002) menyatakan bahwa embriogenesis somatik dapat terjadi baik secara langsung maupun secara tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus. Kalus dapat terbentuk dari eksplan yang masih muda seperti kotiledon buah jeruk yang masih muda. Kotiledon buah jeruk dapat menghasilkan pembentukan embrio somatik karena eksplan kotiledon buah jeruk yang masih muda bersifat meristematis. Dengan demikian bagian kotiledon muda dari jenis jeruk Nipis, jeruk Sundai dan jeruk Kesturi bisa dijadikan sebagai eksplan untuk induksi kalus. Purnamaningsih (2002) menyatakan bahwa penggunaan eksplan yang bersifat meristematis memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil dan kotiledon merupakan bagian yang mudah untuk menghasilkan kalus (Suliansyah, 2002).

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh media, lingkungan tumbuh dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Murashige (1962) menjelaskan ada 4 hal yang perlu diperhatikan dalam pelaksanaan kultur *in vitro* yaitu : karakteristik eksplan, komposisi media, kondisi fisik media dan lingkungan tumbuh kultur. Salah satu media sudah banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman jeruk adalah media MS (Cervera *et al.*, 2000).

Penambahan ZPT seperti 2,4-D kedalam media induksi kalus dapat menghasilkan kalus yang embriogenik. Kalus yang embriogenik dapat

diperbanyak dengan mudah dan bisa menghasilkan planlet dalam jumlah banyak sehingga proses transformasi sangat mudah dilakukan untuk mendapatkan bibit jeruk yang diharapkan. Ali dan Mirza (2006) menggunakan media MS untuk menginduksi kalus jaringan daun, batang dan kotiledon dari kecambah jeruk lemon (*Citrus jambhiri*, L) dengan keberhasilan 16-92% dan untuk induksi kalus pada eksplan kotiledon dengan penambahan 2,4 D sebanyak 1,5 mg/l dengan keberhasilan 80%. Sedangkan menurut Nurwahyuni (2013) medium kultur yang mengandung 2,4-D 1,0 mg/l tanpa BAP dapat menghasilkan kalus dalam jumlah banyak, yaitu hampir menutupi semua permukaan eksplan kultur meristem pucuk jeruk keprok Brastagi. Dari hasil pra penelitian didapatkan hasil bahwa penggunaan konsentrasi 2,4-D dengan konsentrasi yang kurang dari 10 mg/l media dapat menginduksi kalus yang baik, kalus muncul pada minggu kedua setelah tanam pada tanaman jeruk Nipis, jeruk Sundai dan jeruk Kesturi.

Berdasarkan permasalahan yang telah dikemukakan diatas, maka penulis telah melakukan penelitian dengan judul **“Induksi Kalus Beberapa Genotipe Jeruk (*Citrus sp.*) Dengan Menggunakan 2,4-D Secara *In vitro*”**.

B. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Melihat interaksi antara genotipe jeruk dengan konsentrasi 2,4-D dalam menginduksi kalus.
2. Untuk mengetahui genotipe jeruk yang dapat menginduksi kalus.
3. Mendapatkan konsentrasi 2,4-D yang terbaik dalam induksi kalus.

C. Manfaat Penelitian

1. Mengetahui teknik mendapatkan kalus embriogenik dari tanaman jeruk Nipis, jeruk Sundai dan Kesturi.
2. Mengetahui teknik perbanyak tanaman jeruk yang menghasilkan bibit unggul dalam jumlah banyak, bebas hama dan penyakit dalam waktu yang efisien.
3. Sebagai informasi bagi peneliti dalam pemuliaan tanaman.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Jeruk

Tanaman jeruk adalah tanaman buah tahunan yang berasal dari Asia. Cina dipercaya sebagai tempat pertama kali jeruk tumbuh. Sejak ratusan tahun yang lalu, jeruk sudah tumbuh di Indonesia baik secara alami atau dibudidayakan. Tanaman jeruk yang ada di Indonesia adalah peninggalan Belanda yang mendatangkan jeruk manis dan keprok dari Amerika dan Italia. Prospek agribisnis jeruk di Indonesia cukup bagus karena potensi lahan produksi yang luas. Melalui program peningkatan kualitas sumberdaya petani serta didukung dengan hasil inovasi teknologi pemupukan, pengelolaan hama dan penyakit terpadu, serta sistem budidaya lainnya diharapkan mampu meningkatkan kualitas dan kuantitas produksi jeruk (AAK, 1975).

Klasifikasi Tanaman Jeruk

| | |
|------------|---|
| Divisi | : Spermatophyta |
| Sub divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Ordo | : Rutales |
| Keluarga | : Rutaceae |
| Genus | : Citrus |
| Spesies | : <i>Citrus sp.</i> (Rismunandar, 1987) |

Manfaat tanaman jeruk sebagai makanan buah segar atau makanan olahan, dimana kandungan vitamin C yang tinggi. Di Beberapa negara telah diproduksi minyak dari kulit dan biji jeruk, gula tetes, alkohol dan pektin dari buah jeruk yang terbuang. Minyak kulit jeruk dipakai untuk membuat minyak wangi, sabun wangi, esens minuman dan untuk campuran kue. Beberapa jenis jeruk seperti jeruk nipis dimanfaatkan sebagai obat tradisional penurun panas, pereda nyeri saluran napas bagian atas dan penyembuh radang mata. Jenis jeruk lokal yang dibudidayakan di Indonesia adalah jeruk keprok (*Citrus reticulata/nobilis* L.), jeruk siam (*C. microcarpa* L. dan *C. sinensis* L.), jeruk manis (*C. auranticum* L. dan *C. sinensis* L.), jeruk sitrun/lemon (*C. medica*), jeruk besar (*C. maxima*

Herr.), jeruk nipis (*C. aurantifolia*), jeruk purut (*C. hystrix*) dan jeruk sambal (*C. hystrix* ABC) (AAK,1975).

Tanaman jeruk sangat dipengaruhi oleh syarat tumbuhnya. Kecepatan angin yang lebih dari 40-48% akan merontokkan bunga dan buah. Untuk daerah yang intensitas dan kecepatan anginnya tinggi tanaman penahan angin lebih baik ditanam berderet tegak lurus dengan arah angin. Tergantung pada spesiesnya, jeruk memerlukan 5-6, 6-7 atau 9 bulan basah (musim hujan). Bulan basah ini diperlukan untuk perkembangan bunga dan buah agar tanahnya tetap lembab. Di Indonesia tanaman ini sangat memerlukan air yang cukup terutama di bulan Juli-Agustus. Temperatur optimal antara 25-30 °C namun ada yang masih dapat tumbuh normal pada 38 °C. Semua jenis jeruk tidak menyukai tempat yang terlindung dari sinar matahari. Kelembaban optimum untuk pertumbuhan tanaman ini sekitar 70-80%. Jenis tanah Andosol dan Latosol sangat cocok untuk budidaya jeruk. Derajat keasaman tanah (*pH* tanah) yang cocok untuk budidaya jeruk adalah 5,5– 6,5 dengan *pH* optimum 6. Air tanah yang optimal berada pada kedalaman 150–200 cm di bawah permukaan tanah. Pada musim kemarau 150 cm dan pada musim hujan 50 cm. Tanaman jeruk menyukai air yang mengandung garam sekitar 10%. Tanaman jeruk dapat tumbuh dengan baik di daerah yang memiliki kemiringan sekitar 30 °C. Tinggi tempat dimana jeruk dapat dibudidayakan bervariasi dari dataran rendah sampai tinggi tergantung pada spesies (Prihatman, 2000).

Bunga jeruk Sangat harum baunya, berwarna putih cerah, sehingga sangat menarik kehadiran serangga penyerbuk. Bunganya bersifat hermafrodit, kepala sarinya membebaskan tepung sari pada saat kepala putik sedang dalam kondisi reseptif. Namun demikian ada juga beberapa jenis yang kepala sari atau kepala putiknya tidak berfungsi seperti jeruk nipis dan sitrun. Bunga jeruk mempunyai 5 mahkota bunga. Sedangkan bunga jantannya terdiri dari 20-40 tangkai sari dengan warna kepala sarinya kuning. Cairan nektar diproduksi oleh jaringan bagian atas bunga jantan. Nektar diproduksi sampai 48 jam sesudah bunga mekar. Bunga jeruk mekar pagi hari pukul 09.00 hingga pukul 16.00 WIB. Sementara itu, kepala putik sudah matang/reseptif sebelum bunga mekar, sedangkan bunga

jantan matang beberapa jam sesudah bunga mekar. Dengan demikian kemungkinan terjadinya penyerbukan sendiri sangat besar (Rismunandar, 1987).

Tanaman jeruk dapat diperbanyak dengan beberapa cara diantaranya menggunakan biji, cangkokan atau okulasi. Kebanyakan jenis jeruk mempunyai sifat poliembrioni, sehingga keturunannya banyak yang identik dengan induk betinanya. Di Indonesia masih banyak tanaman jeruk yang berasal dari biji sekalipun sebenarnya tidak disengaja. Perbanyakan dengan biji, kadang-kadang belum diketahui dengan tepat apakah bibit tersebut nuselar atau zigotik. Sekalipun nuselar, tanaman ini mempunyai masa juvenil yang cukup lama. Dengan cara ini bibit batang bawah diokulasi dengan batang atas pada usia sangat muda, yaitu 2-3 minggu setelah perkecambahan. Pelaksanaan teknisnya dilakukan di dalam kondisi ruangan yang aseptik. Tujuan lain dari cara ini ialah untuk mendapatkan bibit jeruk yang bebas penyakit terutama penyakit virus dan CVDP (*citrus vein phloem degeneration*) (AAK,1975).

B. Kultur Jaringan

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap kembali. Kultur jaringan memiliki beberapa tujuan, diantaranya menciptakan tanaman baru yang bebas penyakit, memperbanyak tanaman yang sukar diperbanyak secara seksual dan menghasilkan tanaman baru sepanjang tahun (Gunawan, 1988).

Kultur jaringan menggunakan dasar teori sel seperti yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann, yang menyatakan bahwa sel mempunyai kemampuan totipotensi. Totipotensi adalah kemampuan setiap sel dari bagian maupun sel yang diambil, apabila diletakkan dalam lingkungan yang sesuai maka akan tumbuh menjadi tanaman yang lengkap (Nugroho dan Sugito, 1996).

Sistem perbanyakan kultur jaringan ini dapat menghasilkan tanaman baru dalam jumlah yang banyak pada waktu yang singkat. Tanaman baru yang dihasilkan mempunyai sifat-sifat keturunan dan biologis yang sama dengan induknya. Budidaya jaringan ini juga memiliki keuntungan lainnya yakni

membutuhkan sedikit tenaga, waktu dan tidak membutuhkan areal pertanaman yang luas. Teknik kultur jaringan dapat berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi. Syarat tersebut meliputi penggunaan media yang cocok, pemilihan eksplan sebagai bahan dasar pembentuk kalus, keadaan aseptik dan pengaturan udara yang baik (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Kalus merupakan suatu massa sel yang terbentuk pada permukaan eksplan atau irisan eksplan. Kalus dapat diinisiasi menjadi organ, embrio somatik dan sumber variasi somaklonal. Selain itu, kalus dapat dijadikan sumber genetik yang sangat bermanfaat bagi pemuliaan tanaman. Pembentukan kalus tergantung pada komposisi media, eksplan yang digunakan dan zat pengatur tumbuh (Wattimena *et al*, 1992). Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen (Dodds dan Roberts, 1982).

Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman. Tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Pada pengamatan pembentukan kalus sering diamati bahwa pembelahan sel tidak terjadi pada semua sel dalam jaringan asal, tetapi hanya pada sel yang berada pada jaringan *periphery* yang membelah terus menerus, sedangkan sel-sel di tengah tetap. Pembelahan yang terjadi pada lapisan luar dapat disebabkan antara lain karena ketersediaan hara yang lebih banyak dan keluarnya gas CO (Suliansyah, 2002).

Media sebagai salah satu hal pendukung keberhasilan perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan yang memerlukan komposisi nutrisi yang tepat. Suatu jenis tanaman mempunyai kecocokan terhadap suatu jenis media yang belum tentu cocok pada media yang lainnya. Pada tanaman jeruk digunakan media MS (Murashige dan Skoog). Medium ini merupakan media dasar yang banyak digunakan untuk biakan jaringan tanaman karena dapat digunakan untuk tanaman apa saja (Santosa, Djazuli dan Marjono, 1993).

Pada tahun 1962, Thosio Murashige dan Folk Skoog mempublikasikan formulasi media MS (Murashige dan Skoog) yang sampai sekarang terbukti cocok untuk kultur jaringan bagi tanaman. Media MS biasanya dapat digunakan hampir untuk semua tanaman. Media ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral

yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ (Murashige dan Skoog, 1962).

C. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan kultur jaringan, di mana merupakan agen yang mengatur arah pertumbuhan dan perkembangan tanaman di samping lingkungan. ZPT pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara kultur jaringan dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari zat pengatur tumbuh, baik yang bersifat eksogen (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) di dalam media kultur diperlukan untuk merangsang terjadinya pertumbuhan atau pengaturan jenis pertumbuhan (Wetherell, 1982). Ada dua golongan ZPT yang penting yaitu auksin dan sitokinin. ZPT ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan maupun organ. Interaksi dan perimbangan antara ZPT yang akan diberikan ke dalam media yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. Auksin digunakan secara luas dalam kultur jaringan untuk merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ, sedangkan golongan sitokinin sangat penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis (Gunawan, 1995).

Berdasarkan kegunaannya zat pengatur tumbuh digolongkan kedalam lima golongan yaitu: auksin, sitokinin, asam absisik (ABA), giberelin dan etilen. Menurut Wattimena (1988) 2,4-D merupakan salah satu auksin yang mempunyai aktivitas tinggi jika dibandingkan dengan auksin alami seperti IAA. Senyawa 2,4-D digunakan secara luas dalam kultur jaringan terutama untuk merangsang pembentukan kalus yang bersifat embriogenik.

Menurut George dan Sherrington (1984), perimbangan antara zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin sering diperlukan meristem akar atau pucuk adventif. Interaksi yang dijumpai seringkali kompleks dan kombinasi zat pengatur tumbuh yang lebih dari satu macam, ternyata memberikan hasil yang optimal. Auksin

yang umum dipakai adalah IAA, NAA dan 2,4-D. NAA merupakan golongan auksin sintesis yang bersifat lebih stabil dari IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan oleh sel atau pemanasan pada proses sterilisasi. Namun 2,4-D mempunyai kelemahan juga, sebab tanaman yang dibudidayakan dapat mengalami mutasi sehingga banyak terjadi variasi genetik. IAA dapat mengalami degradasi yang disebabkan oleh adanya cahaya atau dapat diuraikan oleh enzim oksidatif. Oleh karena sifatnya yang labil ini IAA jarang digunakan dan hanya merupakan hormon alami yang terdapat dalam jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Interaksi dan perimbangan antara auksin dan sitokinin yang ada pada media dan diproduksi sendiri oleh jaringan eksplan secara endogen, menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan zat pengatur tumbuh eksogen yang sesuai, inilah yang merupakan faktor pendorong untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan tersebut. Pengaturan guna menetapkan jumlah dan perbandingan inilah yang sulit untuk mendapatkan suatu formula yang terbaik bagi setiap penggunaannya (Gunawan, 1988).

Salah satu permasalahan pada perbanyakan kultur jaringan adalah sering terjadi browning (pencoklatan) pada eksplan yang baru ditanam sehingga dapat menghambat pertumbuhan bahkan dapat menyebabkan kematian. Akan tetapi, penggunaan jaringan muda akan dapat mengurangi terjadinya browning atau pencoklatan, dibandingkan dengan penggunaan jaringan tua. Selain penggunaan zat pengatur tumbuh eksogen, terutama pada konsentrasi yang tidak berimbang dapat memacu terjadinya peningkatan eksplan yang mengalami pencoklatan. Untuk dapat mengatasi masalah ini dapat dilakukan berbagai cara antara lain; (1) menghilangkan senyawa fenolik yang terbentuk dengan absorpsi arang aktif, pencucian dengan air mengalir dan pemindahan eksplan dengan sub kultur, (2) menurunkan redoks potensial dan (3) mereduksi fenolase dan menciptakan kondisi yang tidak sesuai dengan penurunan *pH* dan penggelapan (George dan Sherrington, 1984).

Faktor lingkungan yang utama dalam kultur jaringan adalah suhu dan cahaya. Kekuatan penyinaran lampu TL yang baik terhadap pertumbuhan *Asparagus*, *Garbera* dan *Saxifraga* pada media kultur adalah 1000-4000 lux

selama 16 jam. Kelebihan dari lampu TL adalah kemampuan mengubah energi listrik menjadi cahaya tiga kali lebih besar dari lampu pijar dan panas yang dihasilkannya merata (Wetherall, 1982). Suhu yang dibutuhkan pada kultur jeruk adalah antara 25-30°C (Button dan Kochba, 1977).

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Oktober 2014 di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Jadwal kegiatan percobaan dapat dilihat pada Lampiran 1.

B. Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan adalah kotiledon jeruk Nipis, jeruk Sundai, jeruk Kesturi (Lampiran 2) yang diambil dari buah yang masih muda dan telah memiliki biji (umur 4- 7 minggu dihitung dari mulai tumbuh putik). Untuk perlakuan digunakan nutrisi penyusun media, media Murashige dan Skoog (MS) (Lampiran 3), 2,4 D, *Phytigel*TM dengan konsentrasi 7 gr/l media, sukrosa 20 gr/ l media, HCl 0,1 N, KOH 0,1 N, spiritus, *aquadest* steril, alkohol 70%, alkohol 96%, Na-hipoklorit, deterjen, plastik wrap, alumunium foil, plastik bening, lakban bening, karet gelang, tisu dan karton hitam.

Alat yang digunakan adalah gunting, pinset, pisau *scalpel*, botol kultur dengan tinggi 7 cm dan diameter 5 cm, LAFC (*Laminar air flow cabinet*), gelas piala, gelas ukur, *pH* meter, labu semprot, oven, lampu bunsen, kertas label, autoklaf, *hot plate magnetik stirer*, pengaduk gelas, *handsprayer*, timbangan analitik, jangka sorong, label, alat tulis, rak kultur, ruangan yang dilengkapi pengatur suhu dan kamera digital.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan yang dipakai dalam percobaan ini adalah Faktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah eksplan dari beberapa genotipe jeruk dengan 3 taraf (A) yaitu :

A₁ = Jeruk Kesturi

A₂ = Jeruk Nipis

A₃ = Jeruk Sundai

Sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D dengan 4 taraf (B) yaitu:

B_1 = Konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/l media

B_2 = Konsentrasi 2,4-D 5 mg/l media

B_3 = Konsentrasi 2,4-D 7,5 mg/l media

B_4 = Konsentrasi 2,4 D 10 mg/l media

Dengan 2 faktor tersebut maka didapatkan 12 perlakuan, setiap perlakuan diulang 3 kali, sehingga didapatkan 36 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdapat 3 sampel botol kultur, sehingga jumlah botol kultur yang digunakan ada 108 botol. Pada masing-masing botol kultur ditanam 1 eksplan dan semua populasi diamati. Penempatan masing-masing perlakuan secara acak dan denah percobaan dapat dilihat pada Lampiran 4. Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan uji F dan bila berbeda nyata, dilanjutkan dengan DNMRD pada taraf 5%.

D. Pelaksanaan

1. Persiapan Eksplan

Buah jeruk Nipis, jeruk Kesturi dan jeruk Sundai yang telah diambil dari Kecamatan Kuranji, Padang dibersihkan terlebih dahulu dengan air mengalir dan disikat dengan brus. Setelah berada dalam LAFC, dilakukan sterilisasi ulang dengan merendam buah jeruk tersebut kedalam Na-hipoklorit (5,25%) 20% selama 20 menit setelah itu dibilas dengan *aquadest* steril, kemudian buah dibelah vertikal dan biji dikeluarkan dari daging buah, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi *aquadest* steril dan dibilas menggunakan *aquadest* steril sebanyak 3 kali hingga lendir yang menyelimuti biji hilang. Kotiledon diambil dengan membuka kulit biji dan memotong pinggir atas dan bawah kotiledon, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi larutan *aquadest* steril.

2. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan seperti cawan petri, pinset, pisau *scalpel*, gelas beker, labu ukur, pipet ukur, erlenmeyer, pengaduk gelas dan botol kultur. Alat yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan autoklaf, tekanan 15 psi

(*pound per square inch* = besarnya tekanan pada bidang seluas 1 inci) dan suhu 121 °C selama 30 menit, untuk mematikan mikroorganisme dan kontaminan lain yang kemungkinan berkembang setelah pemakaian sebelumnya sehingga tidak terjadi penyebaran bakteri atau spora jamur ketika pencucian.

Selanjutnya peralatan tersebut dicuci menggunakan sabun cuci dan dibilas hingga bersih, setelah itu dilakukan perendaman menggunakan Na-hipoklorit 5ml/l air selama 24 jam pada botol kultur dan peralatan kaca. Kemudian diautoklaf ulang pada botol-botol tersebut dan alat-alat yang telah bersih (alat-alat selain botol kultur terlebih dahulu dibungkus dengan kertas) dengan mempertahankan tekanan 15 psi pada suhu 121°C selama 20 menit, setelah itu dilanjutkan dengan menyimpan alat-alat tersebut di dalam oven pada suhu 40°C sampai saat akan digunakan.

Aquadest yang akan digunakan juga disterilkan menggunakan autoklaf dengan mempertahankan tekanan 15 psi pada suhu 121°C selama 30 menit, proses sterilisasi *aquadest* dengan autoklaf ini membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan proses autoklaf untuk alat dan media, karena biasanya *aquadest* disterilkan dalam volume yang besar (500 ml - 1000 ml) maka tekanan 15 psi harus dipertahankan lebih lama. Lantai dan dinding bagian dalam LAFC, disterilisasi dengan mengusapkan tisu steril pada lantai dan dinding yang telah disemprotkan alkohol 70% dan selanjutnya disterilisasi dengan lampu ultraviolet (*ger medical UV-lamp*) minimal 2 jam sebelum dipakai.

3. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS. Zat kimia penyusun dapat dilihat pada (lampiran 3). Media dikelompokkan menjadi beberapa stok dengan kode I (Makro nutrien), II (Mikro nutrien), III (Besi) dan IV (Vitamin + Asam amino). Hal ini untuk menghindari pengendapan larutan, karena yang telah mengalami pengendapan tidak dapat digunakan lagi. Dalam larutan ini konsentrasinya dipekatkan sehingga saat pembuatan media, hanya memipet sejumlah volume tertentu sesuai takaran yang diperlukan.

Total media yang dibuat untuk induksi kalus sebanyak 4 liter. Cara pembuatan media MS dengan volume 1 liter adalah dipipet larutan stok dan

vitamin sesuai dengan volume larutan baku masing-masing media. Kemudian ditambahkan sukrosa 20 g/l, *pytagel*TM 7g/l, mio inositol 100 mg/liter dan dimasukkan ke dalam gelas piala ukuran 1 liter dan menambahkan 2,4 D sesuai perlakuan. Selanjutnya media dicukupkan volumenya mencapai satu liter dengan menambahkan *aquadest* dan derajat kemasaman diukur dengan menggunakan *pH* meter sehingga *pH* mencapai 5,8. Pengaturan *pH* dilakukan dengan penambahan beberapa tetes NaOH 0,1 N jika terlalu masam atau HCl 0,1 N jika terlalu basa. Kemudian media dipanaskan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* sampai mendidih dan dituangkan ke dalam botol kultur dengan volume 10ml/botol. Botol ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet gelang lalu media di autoklaf dengan mempertahankan tekanan 15 psi pada suhu 121⁰C selama 15 menit setelah itu diinkubasi selama 1 minggu di dalam ruang kultur.

4. Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan kotiledon dilakukan di dalam LAFC. Kotiledon ditanam dalam botol kultur yang telah berisi masing-masing media perlakuan dengan menanam 1 kotiledon tiap botol dengan ukuran 3 – 4 mm. Kemudian botol ditutup dengan menggunakan selotip dan dibalut dengan *plastic wrap*. Setelah dua minggu botol-botol yang berisi kotiledon dikeluarkan dari periode penggelapan dan disusun pada rak kultur sesuai dengan denah penempatan perlakuan (Lampiran 4).

5. Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan terhadap ruang kultur dengan menjaga kebersihan dan suhu ruangan. Botol kultur yang sudah berisi media dan eksplan disemprot dengan alkohol 70%, sedangkan eksplan serta media yang terkontaminasi segera dikeluarkan dari ruangan untuk meminimalisir penularan kepada yang lain.

E. Pengamatan

1. Saat Terbentuk Kalus

Pengamatan bertujuan untuk melihat hari pertama eksplan mulai membentuk kalus dari setiap kombinasi perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati perkembangan eksplan yang dimulai dari penanaman sampai terbentuknya kalus.

2. Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Pengamatan ini bertujuan untuk melihat kemampuan eksplan membentuk kalus. Pengamatan dilakukan pada hari ke 35 setelah tanam, dengan perhitungan rumus :

$$\% \text{ eksplan yang membentuk kalus} = \frac{\sum \text{eksplan yang membentuk kalus}}{\sum \text{populasi tiap satuan percobaan}} \times 100$$

3. Tekstur Kalus

Tekstur kalus diamati secara visual, bagian yang diamati bentuk luar dari kalus. Tekstur kalus kompak atau kalus remah. Jika tekstur kalus kompak yang terbentuk maka kalus termasuk kalus embriogenik sedangkan kalus remah terbentuk maka kalus termasuk kalus organolgenik. Pengamatan dilakukan pada hari ke 35 setelah tanam dan hasil pengamatan didokumentasi menggunakan kamera digital dan dijelaskan secara deskriptif.

4. Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan ada hari ke 35 setelah tanam dengan cara mengamati perubahan warna pada kalus baik kalus yang bewarna putih ataupun kekuningan. Hasil pengamatan didokumentasi menggunakan kamera digital dan dijelaskan secara deskriptif.

5. Berat Segar Kalus

Pengamatan terhadap berat segar kalus dilakukan dengan cara menimbang berat segar kalus dengan timbangan analitik. Dengan cara kalus dikeluarkan dari batol kultur dan ditimbang di timbangan analitik. Data yang digunakan untuk

variabel ini berasal dari 3 botol untuk setiap ulangan. Pengamatan dilakukan pada hari ke 35 setelah tanam.

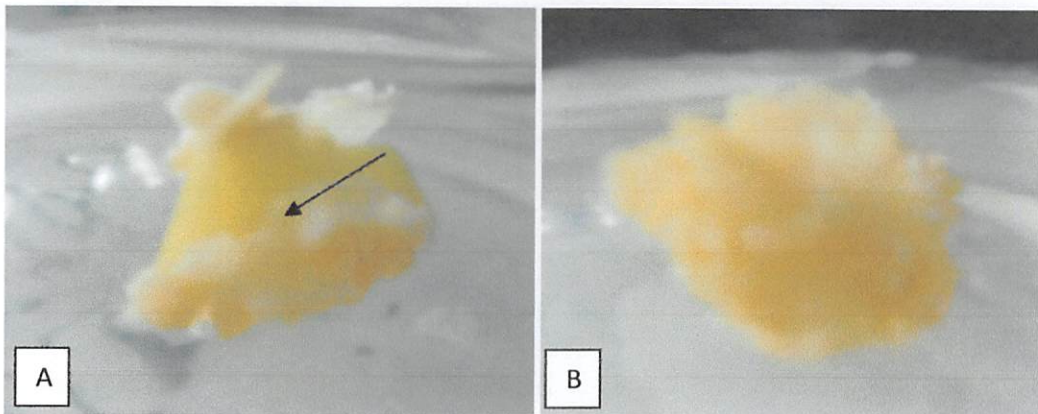
6. Diameter Kalus

Pengamatan terhadap diameter kalus dilakukan dengan cara mengukur diameter kalus dengan menggunakan jangka sorong. Kalus dikeluarkan dari botol kultur dan diukur diameternya dengan jangka sorong. Bagian yang diukur adalah diameter permukaan kalus. Data yang digunakan untuk variabel ini berasal dari 3 botol untuk setiap ulangan. Pengamatan dilakukan pada hari ke 35 setelah tanam.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Saat Terbentuk Kalus

Dalam penelitian ini kalus dihasilkan dari potongan kotiledon yang telah disterilkan dari berbagai genotipe jeruk, di dalam media yang mengandung berbagai konsentrasi 2,4-D. Kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang memiliki kontak langsung dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (Gambar 3A). Selanjutnya seluruh permukaan eksplan tertutupi oleh sel-sel kalus (Gambar 3B).



Gambar 1. Kalus mulai terbentuk pada bekas sayatan eksplan. (A) Kalus terinduksi pada media induksi kalus. (B) Permukaan eksplan mulai tertutupi sel-sel kalus.

Secara *in vitro* kalus terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon (ZPT) yang diberikan. Menurut George dan Sherrington (1984) bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dengan adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah ataupun buatan dari luar ke dalam eksplan.

Hasil dari sidik ragam (Lampiran 5a) terhadap saat terbentuk kalus menunjukkan adanya interaksi antara genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D begitu juga dengan faktor tunggalnya. Data saat terbentuk kalus diuji lanjut dengan DNMRT pada taraf nyata 5% yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Saat terbentuk kalus (HST) beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D

| Genotipe | Konsentrasi 2,4-D (mg/l) | | | |
|---------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------|
| | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |
| | ------(HST)----- | | | |
| Jeruk Nipis | 8,00 b C | 8,33 b C | 9,33 c B | 10,00 b A |
| Jeruk Sundai | 9,00 a B | 9,00 a B | 11,00 a A | 11,00 a A |
| Jeruk Kesturi | 8,00 b B | 8,00 b B | 10,00 b A | 10,00 b A |
| KK = 2,63% | | | | |

Angka-angka yang terletak pada lajur yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka yang terletak pada baris yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata menurut uji DN MRT pada taraf 5%

Pada tabel 1 memperlihatkan, bahwa pada semua genotipe jeruk dengan peningkatan konsentrasi 2,4-D akan mengakibatkan lamanya eksplan membentuk kalus. Pada jeruk Nipis dengan konsentrasi 10 mg/l berbeda nyata dengan konsentrasi 2,5 mg/l, 5 mg/l dan 7,5 mg/l sedangkan pada konsentrasi 2,5 mg/l dan 5 mg/l memberikan pengaruh yang berbeda tidak nyata pada saat eksplan membentuk kalus. Jika kita lihat pada jeruk Nipis dengan penambahan 2,4-D 10 mg/l memperlihatkan saat terbentuk kalus yang lebih lama, hal ini terjadi karena dengan semakin tinggi penambahan konsentrasi maka kalus juga lebih lama terbentuk. Dengan konsentrasi 2,4-D yang tinggi bisa menghambat pertumbuhan terbentuknya kalus. Pada genotipe jeruk Sundai dan Kesturi dengan penambahan konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/l dan 5 mg/l memberikan pengaruh yang berbeda tidak nyata terhadap saat terbentuknya kalus dan begitu juga dengan penambahan konsentrasi 2,4-D 7,5 mg/l dan 10 mg/l.

Konsentrasi 2,5 mg/l memperlihatkan bahwa genotipe jeruk Nipis dan Jeruk Kesturi berbeda tidak nyata terhadap saat terbentuknya kalus dan berbeda nyata dengan jeruk Sundai saat terbentuk kalus. Sama halnya dengan pada konsentrasi 5 mg/l dan 10 mg/l. Sedangkan pada konsentrasi 7,5 mg/l memperlihatkan bahwa ke tiga genotipe jeruk saling memperlihatkan pengaruh yang berbeda nyata antara satu dengan yang lain.

Pemberian 2,4-D yang berbeda akan memberikan reaksi yang berbeda untuk terbentuknya kalus. Keberadaan 2,4-D akan dapat memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan terutama pada kecepatan menginduksi kalus. Hal ini juga disebabkan oleh kandungan auksin pada eksplan (hormon endogen) sangat rendah untuk menginduksi kalus sehingga dengan penambahan 2,4-D kedalam media induksi akan membantu peningkatan auksin sehingga merespon aktivitas sel menginduksi kalus.

Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Tanpa zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan akan terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Pertumbuhan kalus dan organ-organ ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Suhu optimal dan penggunaan jaringan muda sebagai bahan eksplan juga mendukung kecepatan induksi kalus. Jaringan muda memiliki sel-sel yang aktif membelah dan diferensiasi yang tinggi. Sedangkan jaringan tua memiliki sel dengan aktifitas pembelahan dan diferensiasi yang menurun (Wattimena, 1992 dan Pierik, 1987). Tanaman tropis biasanya menghendaki suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman subtropik, yaitu rata-rata 27,7°C dengan kisaran antara 24°C-32°C dan setiap jenis tanaman memiliki suhu optimum untuk pertumbuhan dan perbanyakannya. Suhu ruang inkubasi dalam kultur jaringan akan mempengaruhi keberhasilan hidup eksplan, laju perkembangan kalus dan morfogenesis atau organogenesis (Suliansyah, 2002).

B. Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Hasil sidik ragam (Lampiran 5b) terhadap persentase eksplan membentuk kalus menunjukkan interaksi yang berbeda tidak nyata antara genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D dan begitu juga dengan faktor tunggal memberikan pengaruh yang berbeda tidak nyata terhadap persentase eksplan membentuk kalus. Data persentase eksplan membentuk kalus disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase eksplan membentuk kalus beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai kosentrasi 2,4-D

| Genotipe | Konsentrasi 2,4-D (mg/l) | | | | Rata-rata |
|---------------|--------------------------|--------|--------|-------|-----------|
| | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | |
| | ------(%)----- | | | | |
| Jeruk Nipis | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 88,89 | 97,22 |
| Jeruk Sundai | 100,00 | 100,00 | 88,89 | 88,89 | 94,45 |
| Jeruk Kesturi | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 88,89 | 97,22 |
| Rata-rata | 100,00 | 100,00 | 96,29 | 88.89 | |
| KK = 11,54% | | | | | |

Angka-angka yang terletak pada lajur dan baris yang sama berbeda tidak nyata menurut uji F pada taraf 5%

Pada semua genotipe jeruk dengan peningkatan kosentrasi 2,4-D memperlihatkan interaksi yang berbeda tidak nyata terhadap persentase eksplan membentuk kalus begitu juga dengan faktor tunggalnya memberikan pengaruh yang berbeda tidak nyata terhadap persentase eksplan membentuk kalus. Tabel 2 menunjukkan bahwa hampir seluruh eksplan yang dikulturkan pada media induksi membentuk kalus. Persentase pembentukan kalus cukup tinggi berkisar antara 88,89 – 100%. Dapat dilihat bahwa persentase membentuk kalus tertinggi (100%) terdapat pada genotipe jeruk Nipis, jeruk Sundai dan Jeruk Kesturi dengan penambahan 2,4-D pada kosentrasi 2,5 mg/l dan 5 mg/l. Pada kosentrasi 7,5 mg/l pembentukan kalus jeruk Nipis dan Kesturi sebanyak 100% sedangkan jeruk Sundai hanya 88,89% hal ini disebabkan genotipe jeruk sundai dengan penambahan 2,4-D 7,5 mg/l bukan merespon pertumbuhan kalus tetapi menghambat pertumbuhan kalus. Pada kosentrasi 10 mg/l persentase terbentuknya kalus ketiga genotipe jeruk hanya 88,89%. Semakin tinggi pemberian kosentrasi 2,4-D yang diberikan semakin menurun persentase eksplan yang membentuk kalus. Hal ini terjadi karena dengan penambahan 2,4-D yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan kalus. Golongan auksin 2,4-D merupakan golongan auksin kuat dan bila penggunaan ZPT dalam masa panjang dapat menimbulkan mutasi gen (Gunawan, 1995). Auksin 2,4-D adalah auksin yang paling kuat dan bersifat herbisida jika digunakan dalam kosentrasi tinggi (Wattimena, 1988).

Hal ini terjadi karena pemberian 2,4-D terhadap genotipe jeruk diduga telah menyebabkan terjadinya keseimbangan antara hormon endogen dengan zat pengatur tumbuh eksogen yang diberikan mengakibatkan proses proliferasi sel yang mengarah pada pembentukan persel kalus yang tinggi. Tingginya kemampuan hidup eksplan yang ditanam karena jenis medium dan zat pengatur tumbuh yang diberikan telah memenuhi kebutuhan hidup tanaman.

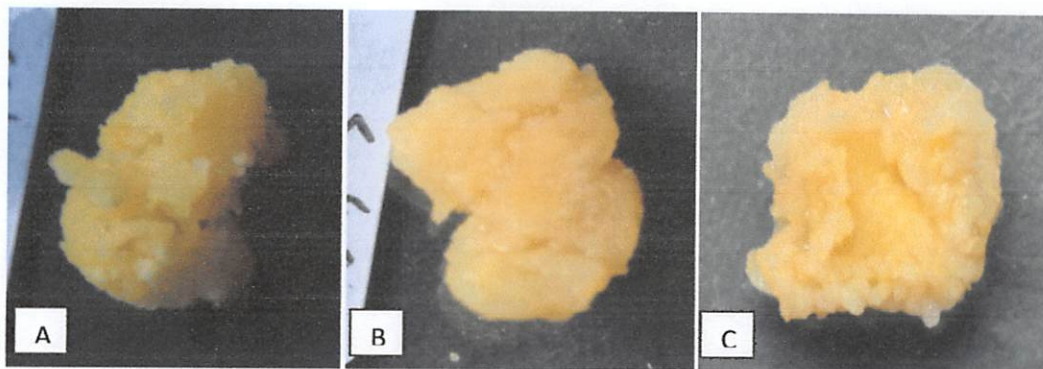
Pembentukan kalus dari jaringan eksplan yang dikulturkan dalam suatu sistem kultur *in vitro* melibatkan perkembangan sel yang berlangsung secara acak dan tidak merata, di samping keterlibatan sel-sel yang belum terspesialisasi dan hilangnya struktur sel-sel yang terorganisasi (Gamborg dan Shyluk 1981). Menurut Dodds dan Roberts (1982), pembentukan kalus pada permukaan eksplan dalam sistem kultur *in vitro* dapat dibagi menjadi tiga tahap perkembangan, yaitu induksi, pembelahan sel dan diferensiasi sel.

Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *In vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi ZPT yang terdapat dalam eksplan, baik bersifat endogen maupun eksogen. ZPT endogen merupakan faktor pemacu untuk proses tumbuh dan morfogenesis eksplan baik untuk membentuk kalus, tunas, akar dan planlet (Gunawan, 1995).

C. Tekstur Kalus

Tekstur kalus umumnya dapat menentukan perkembangan tanaman. Dari pengamatan yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kalus yang dihasilkan dengan penambahan berbagai konsentrasi 2,4-D adalah kalus yang bertekstur kompak (Gambar 2). Kalus yang didapatkan termasuk kalus yang embriogenik.

Dalam menunjang transformasi genetik, baik kalus bertekstur kompak maupun remah (*friable*) sama-sama diperlukan karena kedua jenis kalus memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang menjadi individu baru. Tekstur kompak ditandai dengan bentuk kalus yang rapat dan bersatu, ketika dipindahkan ke media regenerasi kalus juga tidak mudah pecah. Kalus remah ditandai dengan bentuk kalus yang renggang, ketika dipindahkan ke media regenerasi mudah pecah menjadi beberapa bagian.



Gambar 2. Tekstur kalus pada saat umur 35 HST, (A) jeruk Kesturi bertekstur kompak, (B) jeruk Sundai bertekstur kompak dan (C) jeruk Nipis bertekstur kompak.

Menurut Rashid (1988) kompak atau remahnya kalus dipengaruhi oleh kondisi kultur pada saat inisiasi dan pemeliharaan kalus. Kalus yang telah terbentuk harus segera dipindahkan ke media regenerasi. Semakin lama kalus diinkubasi dalam media induksi akan menyebabkan kalus mengalami penurunan daya regenerasinya (Dewi, 2003).

Pembentukan kalus atau organ pada teknik kultur *in vitro* lebih dipengaruhi oleh genotipe sumber jaringan atau bahan yang digunakan sebagai eksplan. Kalus yang dihasilkan dari jaringan tanaman yang berasal dari kekerabatan yang cukup dekat juga dapat berbeda dalam tekstur, warna dan kemampuan morfogenesisnya (Wattimena *et al*, 1992). Menurut George dan Sherrington (1984) bahwa bentuk, tekstur, warna dan kemampuan morfogenetik serta diferensiasi kalus tergantung pada usia dan jaringan kalus yang digunakan sebagai eksplan.

D. Warna kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan secara visual dengan mengamati warna kalus yang terbentuk umumnya bewarna putih, kuning dan kekuningan. Pada kalus yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi 2,4-D umumnya bewarna putih kekuningan dan kekuningan (Gambar 3). Data warna kalus disajikan pada Tabel 3.

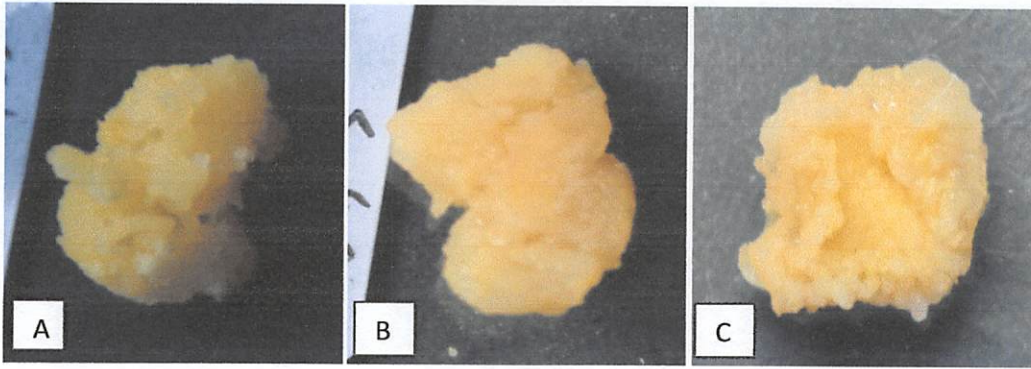
Tabel 3. Warna kalus beberapa genotipe jeruk (35 HST) dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D

| Genotipe | Warna kalus (35 HST) pada konsentrasi 2,4-D (mg/l) | | | |
|---------------|--|---------------------|---------------------|------------|
| | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |
| Jeruk Nipis | Putih kekuningan | Putih kekuningan | Putih kekuningan | Kekuningan |
| Jeruk Sunadai | Putih kekuningan | Putih kekuningan | Putih kekuningan | Kekuningan |
| Jeruk Kesturi | Putih kekuningan | Putih kekuningan | Kekuningan | Kekuningan |

Warna kalus putih kekuningan terbentuk pada jeruk Nipis dan Jeruk Sundai pada konsentrasi 2,5 mg/l, 5 mg/l dan 7,5 mg/l dan untuk jeruk Kesturi warna putih kekuningan terbentuk pada konsentrasi 2,5 mg/l dan 5 mg/l. Warna kekuningan terbentuk pada jeruk Kesturi dengan penambahan 2,4-D konsentrasi 7,5 mg/l dan 10 mg/l. Pada jeruk Nipis dan jeruk Sudai warna kekuningan terbentuk pada konsentrasi 10 mg/l. Perbedaan warna kalus menunjukkan bahwa tingkat perkembangan kalus berbeda-beda. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda.

Tekstur, bentuk dan warna kalus dipengaruhi oleh sumber eksplan yang digunakan. Selain sumber eksplan, komposisi medium, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan juga mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut. Kondisi lingkungan kultur untuk induksi kalus pada penelitian ini bersuhu 25±2°C, namun adakalanya berubah akibat gangguan listrik, sehingga suhu ruangan kurang stabil.

Selama masa perkembangan kalus, jika semakin lama berada dalam media tanam akan mengalami degradasi fisiologis akibat kekurangan unsur hara atau hormon tumbuhnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Gunawan (1988) menyatakan bahwa kalus yang ditumbuhkan pada suatu media, perlu dipindahkan secara teratur dalam jangka waktu tertentu, jika masa kultur yang panjang dalam media yang tetap akan menyebabkan terjadinya kehabisan hara dan air serta sel-sel dalam kalus juga mengeluarkan senyawa hasil metabolisme yang menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri.



Gambar 3. Warna kalus pada saat umur 35 HST, Warna kekuningan jeruk (A) Kesturi, Warna putih kekuningan (B) jeruk Sundai dan (C) jeruk Nipis

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening namun akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang akan semakin tua. Kalus yang berwarna kekuningan cenderung bersifat embriogenik sedangkan warna kalus kecoklatan, kehijauan atau putih cenderung tidak bersifat embriogenik. Morfogenesis kalus melibatkan suatu hubungan yang kompleks antara eksplan, komposisi media dan kondisi lingkungan (Gunawan, 1988).

Lestari (2011) menyatakan, untuk memacu pembentukan kalus embriogenik dan struktur embrio somatik seringkali auksin diperlukan dalam konsentrasi yang relatif tinggi. Gunawan (1995) menyatakan bahwa suatu eksplan yang ditanam dalam medium akan menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Arah pertumbuhan dan perkembangannya ditentukan oleh beberapa hal, yaitu: komposisi medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan, bagian yang dijadikan eksplan serta lingkungan tempat tumbuhnya.

E. Berat segar kalus

Hasil sidik ragam (Lampiran 5c) terhadap berat segar kalus menunjukkan interaksi yang berbeda tidak nyata antara genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D. Faktor tunggal genotipe jeruk memperlihatkan pengaruh yang berbeda tidak nyata sedangkan faktor tunggal konsentrasi 2,4-D terhadap berat segar kalus menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata dan hasil uji lanjut DNMRT pada taraf 5% dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Berat segar kalus (mg) umur 35 HST beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D

| Genotipe | Konsentrasi 2,4-D (mg/l) | | | | Rata-rata |
|---------------|--------------------------|----------|----------|----------|-----------|
| | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | |
| | ------(mg)----- | | | | |
| Jeruk Nipis | 364,17 | 405,63 | 344,07 | 297,67 | 352,88 |
| Jeruk Sundai | 246,63 | 443,17 | 240,73 | 317,27 | 311,95 |
| Jeruk Kesturi | 264,87 | 305,83 | 344,27 | 299,97 | 278,73 |
| Rata-rata | 291,89 B | 384,88 A | 309,69 B | 304,97 B | |
| KK = 21,64% | | | | | |

Angka-angka yang terletak pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata menurut uji lanjut DNMRT pada taraf 5%.

Tabel 4 memperlihatkan bahwa pemberian konsentrasi 2,4-D menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata terhadap berat segar kalus. Dapat dilihat pada konsentrasi 5 mg/l menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata dengan konsentrasi 2,5 mg/l, 7,5 mg/l dan 10 mg/l. Pada konsentrasi 5 mg/l merupakan berat segar kalus yang tertinggi dengan rata-rata 384,88 mg. Pemberian 2,4-D pada konsentrasi tersebut mampu menciptakan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan dan diferensiasi sel, hal ini terjadi karena secara fisiologis auksin berperan dalam mendorong perbesaran dan perpanjangan sel, sehingga dengan semakin besar dan panjangnya sel dalam hal ini kalus akan dapat meningkatkan berat segar kalus yang terbentuk. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) pemberian hormon eksogen akan menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk kedalam sel dan sel akan membesar dan memanjang.

Pierik (1987), George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa perbedaan pengaruh ZPT pada eksplan disebabkan perbedaan kandungan hormon endogen dan dengan ZPT eksogen akan merubah kandungan hormon tersebut dan selanjutnya mempengaruhi proses dan pembelahan sel. Setiawan (2001) menyatakan bahwa bobot basah kalus menggambarkan biomassa jaringan yaitu hasil sintesis dan kandungan air dalam jaringan, sehingga dapat juga dilihat peran

auksin yang mampu untuk mendorong perbesaran dan perpanjangan sel, dimana semakin besar dan panjang sel, maka bobot basah yang akan dihasilkan semakin meningkat.

F. Diameter Kalus

Hasil sidik ragam (Lampiran 5d) menunjukkan adanya interaksi yang berbeda tidak nyata antara genotipe dan kosentrasi 2,4-D terhadap diameter kalus. Faktor tunggal genotipe jeruk menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata terhadap diameter kalus sedangkan faktor tunggal kosentrasi 2,4-D menunjukkan pengaruh yang berbeda tidak nyata. Data diameter kalus tersebut disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Diameter kalus (cm) umur 35 HST beberapa genotipe jeruk dengan pemberian berbagai kosentrasi 2,4-D

| Genotipe | Konsentrasi 2,4-D (mg/l) | | | | Rata-rata |
|---------------|--------------------------|------|------|------|-----------|
| | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | |
| | ------(cm)----- | | | | |
| Jeruk Nipis | 1,83 | 1,78 | 2,00 | 1,98 | 1,90 a |
| Jeruk Sundai | 1,78 | 1,63 | 1,53 | 1,30 | 1,56 b |
| Jeruk Kesturi | 1,53 | 1,65 | 1,57 | 1,50 | 1,56 b |
| Rata-rata | 1,71 | 1,68 | 1,70 | 1,59 | |
| KK = 14,58% | | | | | |

Angka-angka yang terletak pada lajur yang sama yang diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut uji lanjut DNMRT pada taraf 5%.

Tabel 5 menunjukkan adanya pengaruh berbeda tidak nyata antara kosentrasi 2,4-D terhadap diameter kalus tetapi pada semua genotipe jeruk menunjukkan adanya pengaruh berbeda nyata terhadap diameter kalus. Jeruk Nipis menunjukkan pengaruh berbeda nyata dengan jeruk Sundai dan jeruk Kesturi sedangkan jeruk Sundai memberikan pengaruh yang berbeda tidak nyata dengan Kesturi. Rata-rata diameter kalus yang tertinggi 1,9 cm pada genotiepe jeruk Nipis. Hal tersebut berkemungkinan berhubungan dengan kemampuan masing-masing genotipe dalam membentuk kalus serta formulasi media yang

digunakan dalam menginduksi pembentukan kalus. Genotipe yang lebih responsif menghasilkan ukuran kalus yang lebih besar, demikian pula dengan perlakuan formulasi media yang digunakan.

Semakin bertambahnya ukuran kalus pada saat diinduksi, terutama penambahan ukuran ke arah area meristematik menjadi acuan bahwa jumlah sel-sel kalus juga semakin bertambah. Menurut Gunawan (1988) kemampuan pembentukan kalus dari jaringan tergantung juga dari umur fisiologis dari jaringan waktu diisolasi, musim pada waktu bahan tanaman diisolasi, bagian tanaman yang digunakan dan jenis tanaman.

Pertumbuhan dan morfogenesis secara *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara hormon tanaman yang ditambahkan pada medium (hormon eksogen) dan hormon tanaman (hormon endogen) yang dihasilkan sendiri oleh sel yang dikulturkan (George dan Sherrington, 1984). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) pemberian hormon eksogen akan menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel akan membesar dan memanjang.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan pada induksi kalus beberapa genotipe jeruk (*Citrus sp*) dengan menggunakan 2,4-D secara *in vitro* dapat diambil kesimpulan :

1. Pemberian konsentrasi 2,4-D pada berbagai genotipe jeruk yang digunakan menunjukkan adanya interaksi terhadap saat terbentuk kalus.
2. Semua genotipe jeruk yang digunakan dapat menginduksi kalus, genotipe yang paling cepat dalam menginduksi kalus adalah jeruk Nipis.
3. Kosentrasi 2,5 mg/l merupakan kosentrasi terbaik pada saat muncul kalus, persentase eksplan membentuk kalus dan diameter kalus.

B. Saran

Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan kosentrasi 2,5 mg/l pada media dapat menginduksi terbentuknya kalus pada kultur tanaman jeruk Nipis, jeruk Sundai dan jeruk Kesturi, tetapi kalus yang didapatkan belum memenuhi kriteria kalus yang embriogenik. Jadi diharapkan penelitian ini dapat menjadi acuan untuk penelitian yang lain dalam mencari kosentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk menginduksi kalus yang embriogenik pada berbagai genotipe jeruk sehingga hal tersebut dapat bermanfaat dalam merakit tanaman jeruk yang baru.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1975. Bertanam pohon buah-buahan II. Kanisius. Yogyakarta. 206 hal.
- Ali, S. and B. Mirza. 2006. *Micropropagation of rough lemon (Citrus jambhiri Lush.): Effect of explant type and hormone concentration*. Acta Bot. Croat. 65 (2) : 137 – 146.
- Button, J. and J. Kochba. 1977. *Tissue culture in citrus industry*. In: Reinert, J and Y. P. S. Bajaj (ed): *Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue, and organ culture*. Narosa Publishing House. New Delhi. Bombai. p 71-92.
- Blanc, GN., Michaux-Ferriere., C. Teisson., L. Larder and M. P. Carron.1998. *Effects of carbohydrate addition on the induction of embryogenesis in Havea brasiliensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59 : 103 – 112.
- Cervera, M., C. Ortega, A. Navarro, L. Navarro and L. Pena.2000. *Generation of transgenic citrus plants with tolerance to salinity gene Hal2 from yeast*. J. Hort. Sci. Boitechnol. 75 : 26 - 30.
- Dewi, I. S. 2003. Peranan fisiologis poliamin dalam regenerasi tanaman pada kultur antera padi (*Oryza sativa* L.). Disertasi Pasca Sarjana, IPB. 147 hal.
- Direktorat Jenderal Hortikultura. 2012. Produksi luas dan produktivitas buah-buahan, sayuran, tanaman hias dan obat. 20 hal.
- Dodds, J. H. and L. W. Roberts. 1982. *Experiment in plant tissue culture*. Cambrige University Press. Cambrige. 171 p.
- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. 1981. *Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture*. In: T. A. Thorpe (ed.): *plant tissue culture, method and aplication in agriculture*. Academic press. New York. p 45-112.
- George, E. F. and P. D, Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and directory of comercial laboratory. Exegetics Ltd. England. 709 p.
- Gunawan, L. W. 1988. Teknik kultur jaringan tumbuhan. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor 304 hal.
- Gunawan, L. W. 1995. Teknik kultur *in vitro* dalam hortikultura. Penebar Swadaya. Jakarta. 115 hal.

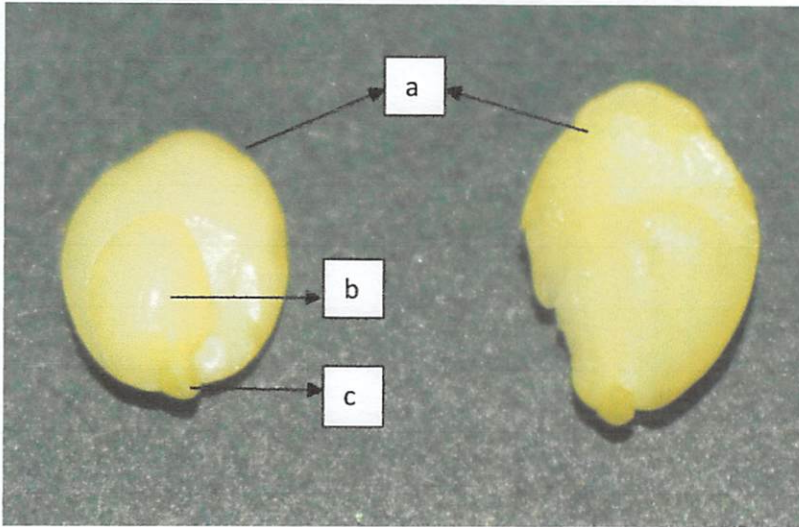
- Hendaryono, D. P. S. dan Wijayani, A. 1994. Teknik kultur jaringan, pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif modern. Yogyakarta. Kanisius. 139 hal.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 7(1):63-68.
- Murashige T. F. Skoog. 1962. *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Culture*. *Physiologia Plantarum*. 15 : 473 – 496.
- Molina, D. M., M. E. Aponte., H. Cortina and German Moreno. 2002. *The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71 : 117 - 125.
- Nugroho, A. dan Sugito, H. 1996. Pedoman pelaksanaan teknik kultur jaringan. Penerbit Swadaya. Jakarta. 1 - 3 hal.
- Nurwahyuni, I. 2013. Teknik *in vitro* jeruk keprok brastagi (*Citrus Nobilis* Brastepu) sebagai strategi biokonservasi mengatasi kepunahan jeruk lokal Sumatera Utara. *Semirata FMIPA Universitas Lampung*. 419 - 427 hal.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus. NUKHOFF Publ. Bostom. 334 hal.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. 5 (2) : 51 – 58.
- Prihatmal, K. 2000. Budidaya jeruk. Sistem informasi dan manajemen pembangunan di pedesaan, BAPPENAS. Jakarta. 1-16 hal.
- Rashid, A. 1988. *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants vol 1*. CRC Press Inc., Florida. 169 p.
- Rismunandar. 1987. Bertanam jeruk. PT. Gramedia. Jakarta. 159 hal.
- Setiawan, I. 2001. Inisiasi Kalus Eksplan Daun Melinjo (*Gnetum gnemon*, L) pada Berbagai Arang Aktif dengan Berbagai Konsentrasi BAP+NAA Secara In Vitro. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. 38 hal.
- Santosa, B., Djazuli., dan Marjono. 1993. Modifikasi media untuk perbanyakan tanaman ubi kayu secara *in vitro*. *Bogor*. 3 : 59 - 63.
- Suliansyah, I. 2002. Buku ajar kultur jaringan tanaman. Program Studi Agroekoteknologi. Fakultas Pertanian. Universitas Andalas. Padang. 200 hal.
- Wattimena, G. A., L. W. Gunawan, N. A. Mattjik, E. Syamsudin, N. M. A. Wiendi, A. Ernawati. 1992. Bioteknologi tanaman. PAU IPB. Bogor. 309 hal.

- Wattimena, G. A. 1988. Zat pengatur tumbuh tanaman. PAU IPB. Bogor. 145 hal.
- Wetherell, D. F. 1982. Pengantar propagasi tanaman secara *in vitro*. Koesoemardiyah, penerjemah. Fakultas Farmasi. Univ. Gadjahmada. 109 hal.
- Zurkarnain. 2009. Kultur jaringan tanaman. PT Bumi Aksara. Jakarta. 249 hal.

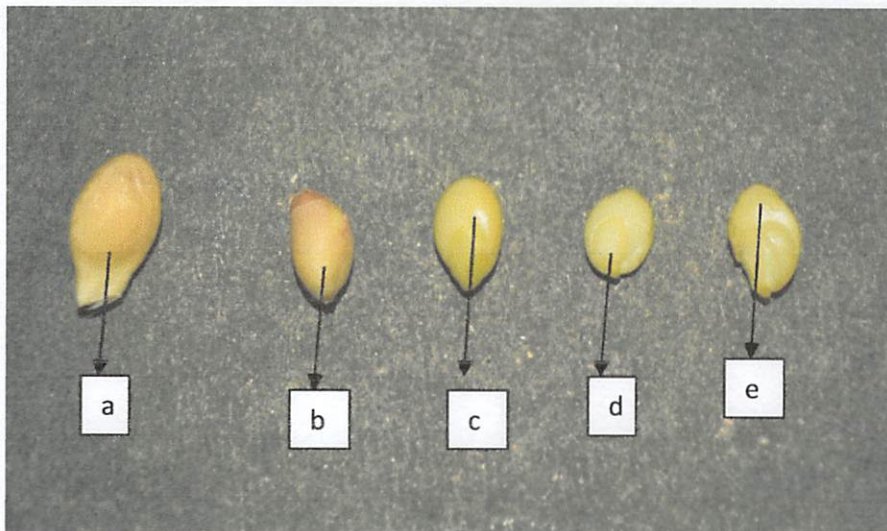
Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Percobaan Bulan September Sampai Oktober 2014

| No | Kegiatan | Minggu Ke- | | | | | | | |
|----|------------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1 | Persiapan Alat & Bahan | | | | | | | | |
| 2 | Sterilisasi Alat | | | | | | | | |
| 4 | Pembuatan Media | | | | | | | | |
| 5 | Penanaman Eksplan | | | | | | | | |
| 6 | Pemeliharaan | | | | | | | | |
| 7 | Pengamatan | | | | | | | | |
| 8 | Induksi Kalus | | | | | | | | |
| 9 | Pengolahan Data | | | | | | | | |

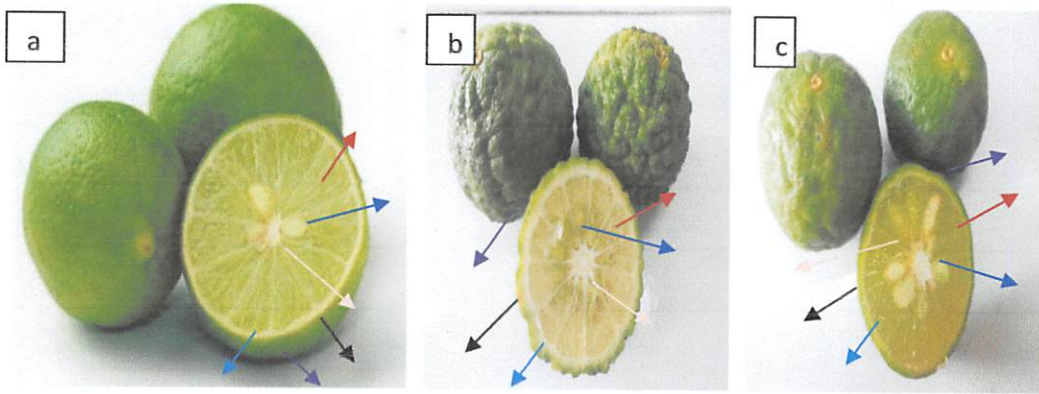
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



Gambar A. Biji jeruk Nipis, (a) kotiledon (b) embrionik axis (c) radikel



Gambar B. Biji Jeruk Nipis, (a) Biji utuh dengan exsocarp (b) biji dengan endocarp (c) biji tanpa kulit (d) embrionik axis (e) kotiledon



Gambar C. Buah dari berbagai jenis jeruk (a) jeruk Nipis, (b) jeruk Sundai dan (c) jeruk Kesturi.

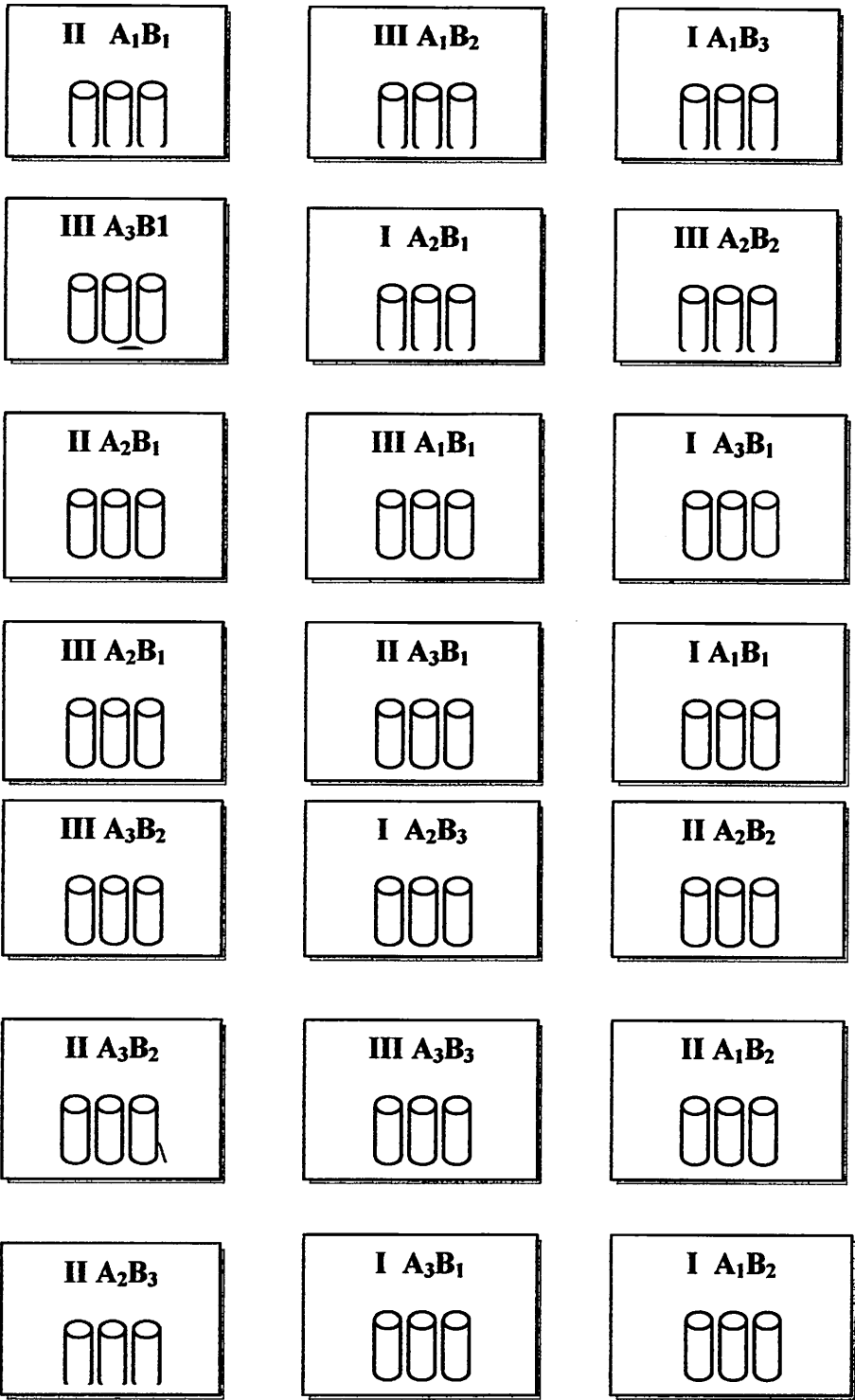
Keterangan. —→ (biji) —→ (juice sac) —→ (plasenta) —→ (flavedo)
 —→ (skin) —→ (albedo)

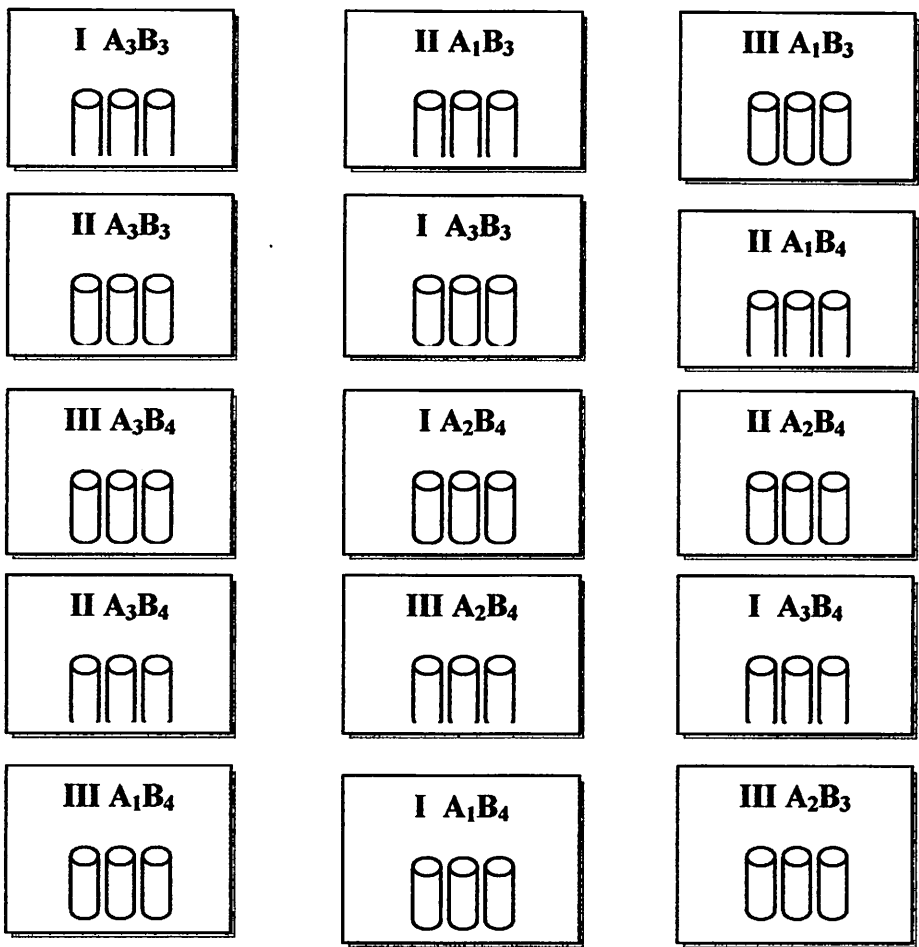
Lampiran 3. Komposisi Media Dasar Murashige dan Skoog

| Larutan baku | Senyawa penyusun | Kosentrasi larutan baku (g/l) | Volume Larutan Medium (ml/l) | Konsentrasi dalam medium (mg/l) |
|--------------|---|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| A | NH ₄ NO ₃ | 82,500 | 20,00 | 1.650,000 |
| B | KNO ₃ | 95,000 | 20,00 | 1.900,000 |
| C | KH ₂ PO ₄ | 34,000 | 5,00 | 170,000 |
| | H ₃ BO ₃ | 1,240 | | 6,200 |
| | KI | 0,166 | | 0,830 |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,050 | | 0,250 |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,005 | | 0,025 |
| D | CaCl ₂ .2H ₂ O | 88,000 | 5,00 | 440,000 |
| E | MgSO ₄ .7H ₂ O | 74,000 | 5,00 | 370,000 |
| | MnSO ₄ .4H ₂ O | 4,460 | | 22,300 |
| | ZnSO ₄ .4H ₂ O | 1,720 | | 8,600 |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,005 | | 0,025 |
| F | Na ₂ EDTA | 7,460 | 5,00 | 37,300 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | 5,560 | | 27,800 |
| | Thiamin-HCl | 0,010 | 10,00 | 0,100 |
| | Nicotinic acid | 0,050 | | 0,500 |
| | Pyridoxin-HCl | 0,050 | | 0,500 |
| | Glycine | 0,200 | | 2,000 |
| | Myo-inositol | 10,000 | | 100,000 |
| | Sukrosa | 20,000 | | |
| | pytagel™ | 7,000 | | |

Sumber : Murashige dan Skoog, 1962 pH : 5,8

Lampiran 4. Denah Penempatan Botol Kultur Di Laboratorium Secara RAL





Keterangan :

A₁,A₂,A₃ dan B₁,B₂,B₃,B₄ = perlakuan

 = botol kultur

I, II, dan III = ulangan

Lampiran 5. Tabel Analisis Ragam Dari Beberapa Variable Pengamatan

5 a. Tabel Sidik Ragam Saat Terbentuk Kalus

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F-hitung | | F-tabel |
|------------------|----|-------|-------|------------|---|---------|
| | | | | | | 5% |
| A | 2 | 8,72 | 4,36 | 72,67 | * | 3,46 |
| B | 3 | 30,53 | 10,18 | 169,67 | * | 3,01 |
| AxB | 6 | 1,06 | 0,18 | 3 | * | 2,51 |
| Galat | 24 | 1,33 | 0,06 | KK = 2,63% | | |
| Total | 35 | 41,64 | | | | |

5 b. Tabel Sidik Ragam Persentase Eksplan Membentuk Kalus

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F-hitung | | F-tabel |
|------------------|----|---------|--------|-------------|----|---------|
| | | | | | | 5% |
| A | 2 | 62,11 | 31,05 | 0,25 | tn | 3,46 |
| B | 3 | 246,86 | 82,29 | 0,67 | tn | 3,01 |
| AxB | 6 | 678,49 | 113,08 | 0,92 | tn | 2,51 |
| Galat | 24 | 2962,41 | 123,43 | KK = 11,54% | | |
| Total | 35 | 3949,87 | | | | |

5 c. Tabel Sidik Ragam Berat Segar Kalus

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F-hitung | | F-tabel |
|------------------|----|-----------|----------|-------------|----|---------|
| | | | | | | 5% |
| A | 2 | 16635,10 | 8317,55 | 1,70 | tn | 3,46 |
| B | 3 | 47691,58 | 15897,19 | 3,26 | * | 3,01 |
| AxB | 6 | 59686,87 | 9947,81 | 2,04 | tn | 2,51 |
| Galat | 24 | 117168,86 | 4882,04 | KK = 21,64% | | |
| Total | 35 | 241182,41 | | | | |

5 d. Tabel Sidik Ragam Diameter Kalus

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F-hitung | | F-tabel |
|------------------|----|------|------|-------------|----|---------|
| | | | | | | 5% |
| A | 2 | 0,91 | 0,46 | 7,67 | * | 3,46 |
| B | 3 | 0,08 | 0,03 | 0,50 | tn | 3,01 |
| AxB | 6 | 0,44 | 0,07 | 0,17 | tn | 2,51 |
| Galat | 24 | 1,51 | 0,6 | KK = 14,58% | | |
| Total | 35 | 2,94 | | | | |